

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平 6 - 3 8 7 3 0

(43) 公開日 平成 6 年 (1 9 9 4) 2 月 1 5 日

(51) Int. Cl. ⁵

識別記号

庁内整理番号

F i

技術表示箇所

C12M 1/00

Z

// C12N 5/06

11/08

A

9281-4B

C12N 5/00

E

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願平 3 - 3 1 4 2 5

(22) 出願日 平成 3 年 (1 9 9 1) 2 月 1 日

(71) 出願人 0 0 0 1 8 2 2 3 6

サカイエネックス株式会社

福井県福井市花堂中 2 丁目 1 5 番 1 号

(72) 発明者 大濃 正直

福井県坂井郡丸岡町石城戸町 1 丁目 1 1 番
地

(72) 発明者 安田 公昭

福井県吉田郡松岡町平成 1 2 9 番地

(72) 発明者 野尻 美智代

福井県福井市春山 2 丁目 1 1 番 1 3 号

(74) 代理人 弁理士 野間 忠夫 (外 1 名)

(54) 【発明の名称】 動物細胞培養用担体

(57) 【要約】

【目的】 動物細胞の成長にとって適切な環境を損なうことなく、高密度に細胞を固定化し培養出来る動物細胞培養用担体の開発に関するものである。

【構成】 セルロース製連続発泡体に陽イオン重合体ポリエチレンイミンを結合させることを特徴とし、更に連続発泡体の粒子径、平均孔径、比表面積、真比重、見掛密度に就いて最適範囲を数値的に限定したものである。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 セルロース製の連続発泡体に陽イオン重合体ポリエチレンイミンを結合させた動物細胞培養用担体。

【請求項 2】 連続発泡体の膨潤時の粒子径が $0.5\text{mm} \sim 5.0\text{mm}$ 、平均孔径が $0.1 \sim 1.63$ 、比表面積が $1.0 \sim 10.0\text{m}^2/\text{g}$ 、真比重が $1.1 \sim 1.6\text{g}/\text{cm}^3$ 、見掛け密度が $0.03 \sim 0.04\text{g}/\text{cm}^3$ の 3 次元網目構造を持つ連続発泡セルロースである請求項 1 記載の動物細胞培養用担体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は動物細胞を培養するために用いられる担体に関するものである。動物細胞を大量培養する場合、出来るだけ表面積の大きな担体に細胞を固定化させて高密度培養するのが一般的であるが、本発明は細胞の成長にとって適切な環境を損なうことなく、高密度に細胞を固定化し培養出来る動物細胞培養用担体に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 細胞培養を実施する場合、殆どの動物細胞は固体表面に付着させないと増殖させることが出来ない。そのために、培養スケールの大きさに係らず何等かの固体表面を用意する必要がある。特に細胞の大量培養に於いては、その生産性の向上のために凡ゆる方法を用いて培養容積当りの表面積を大きくする努力が払われている。之等の方法の中で、現在最も一般的なものがマイクロキャリア培養法である。この方法はマイクロキャリアという比較的表面積の大きな担体を培養液中で懸濁させて使用することにより、培養液体積当たりの培養面積を最も大きく採ることが出来る方法の一つである。

【0003】 マイクロキャリアは多糖類やポリスチレンなどのポリマーを粒子径 $100 \sim 300\mu\text{m}$ のビーズ状にし、そのビーズ表面に細胞を固定させる動物細胞培養用担体である。更にマイクロキャリアは細胞の付着性を高める為に、コラーゲンで担体表面をコーティングしたり、化学的合成により正の電荷を持たせる等の処理をして造られている。前者のコラーゲン型担体が天然物であるコラーゲンにより高い生物親和性を示すというメリットを持つのに対し、後者の電荷型担体はコラーゲン型担体では固定化出来ない浮遊性細胞をも固定化出来る点や、プロテアーゼ等の酵素を用いて細胞を回収した後も担体の繰り返し使用が出来るという利点がある。

【0004】 それぞれ目的に応じた使い分けがなされている。この電荷型担体はポリエチレンアミノエチル基に代表される 3 級アミノ基若しくは 4 級アミノ基をカチオン基として担体に導入して造られており、主な商品としてファルマシア (Pharmacia) 社製のサイトデックス (Cytodex 1、Cytodex 2) などがある。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 大量に細胞を培養する場合、大きな比表面積を持つマイクロキャリアを培養用担体とするのが最も一般的ではあるが、マイクロキャリアの比表面積でも未だ充分とは言えず、動物細胞を扱う各産業界で更に高密度の培養が可能になる担体の開発が待望されている。更に、マイクロキャリアを激しく流動する培養液中で使用したり、培養液中に多くのマイクロキャリアを充填し過ぎたりすると、担体同士の衝突の頻度と衝撃が大きくなるので、固定化した細胞が損傷を受け生存出来ない状態になる。之等の問題はマイクロキャリアの場合、固定化に寄与するのは担体表面のみで担体内部は固定化に寄与していない事に起因している。

【0006】 一方、細胞付着性を高める目的でマイクロキャリアに導入されているカチオン基は 3 級或いは 4 級アミノ基の単量体または 2 量体が結合した状態であるので、低分子の直鎖が担体から伸びた状態となっている。よって一度結合部位が何等かの損傷を受けて切断されるとカチオン基が遊離し細胞の成育に悪影響を与えることがある。またカチオン基となるアミノ基は化学合成的手法により導入せざるを得ない為、そのマイクロキャリア中に占める相対量が多くなると細胞毒性が現れ始めるため、導入出来る電荷量にも限界がある。更に担体とカチオン基を結合している分子鎖は非常に短いので電荷は担体素材表面にしか分布しておらず、細胞を担体に固定化させるのに必要な吸着空間が担体上のみに限定されて了う。また之等のアミノ基は塩基性が強いので、使用するには何度も緩衝液等で置換して培養液に最適である中性付近の pH に調整しなければならないという操作上不都合な問題もある。

【0007】

【課題を解決するための手段】 上記の問題点を解決するために本発明者等は動物細胞培養用担体を構成する素材とカチオン基の 2 点に就いて改良を試み、本発明を完成するに至った。

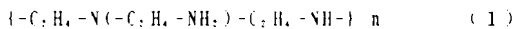
【0008】 本発明の担体の素材にはセルロースの連続発泡体を用いる。この発泡体は木材から造った高純度パルプを化学処理したビスコースに少量の補強材と気孔を形成する結晶物を加えて混合シ字型に注入の上、加熱後、冷却して凝固することや或いはこの混合物を凝固液中に滴下することによりビーズ状に成型することなどにより造られる。セルロースの表面は強い親水性を示すため、水系で用いる限り支持体表面は水溶液と同様に振る舞うことが出来、細胞との親和性が良い。また細胞に対する毒性は全く無い。

【0009】 数多くの細孔が連続して繋がっている連続発泡体は培養液等を担体内部に容易に通すため、この細孔の孔径を $0.1 \sim 1.63\text{mm}$ のサイズにする事により培養液中の栄養素や酸素を速やかに供給出来る。一方、細胞の出した老廃物等を速やかに除去出来るので担体表面だけ

ではなく担体内全てに於いて細胞が成育可能となる。この特殊な構造により従来の表面にしか付着させることが出来なかったタイプのマイクロキャリアに比べ約10倍の比表面積を持たせることが出来、高密度な細胞の固定化が実現を可能とした。

【0010】また、このスポンジ状の連続発泡構造は固定化された細胞を担体内部に保護した上で衝突の衝撃を吸収するので、培養液の流動による担体同士の衝突によって細胞がダメージを受けることが無い。同様に、スピンナーフラスコ等の培養器で生ずる大きな剪断力から細胞を保護するので、担体を分散させるに十分な流速になるまで回転数を上げることが出来る。この様な効果により通常の担体に比べ高い充填率を採ることが可能になる。

【0011】本発明がカチオン基として導入する物質にはポリエチレンジイミン(1)を用いる。



【0012】ポリエチレンジイミンは酸触媒の存在下で重合させて得られ、その構造は高度に枝分かれした樹枝状構造を有し、透明で粘稠な水溶性ポリマーである。ポリエチレンジイミンを本発明のカチオン基に採用するのは、以下の特徴により細胞の付着性を向上させる事と、合成物であるカチオン基が与える細胞への悪影響を最小限に抑える事による。即ち天然物ではない導入カチオン基は可能な限り少量にするのが好ましいが、ポリエチレンジイミンは現存する高分子素材の中で最もカチオン化密度が高いので最小の導入量で細胞を付着させる能力があり、細胞付着能が大きく且つ細胞毒性の小さい動物細胞培養用担体と言える。

【0013】また官能基となるカチオン分子が直鎖の場合、損傷を受けて分子鎖が切断されると担体と結合していない方の一端が培養液中へ溶出して丁うが、枝分かれ構造を持つポリエチレンジイミン分子は複数の末端基それぞれが担体に結合しているので遊離し難い構造となっている。また低分子の官能基の場合、担体素材表面にしか荷電基が存在出来ないのに対し、高分子のポリエチレンジイミンは担体素材表面のみならず担体から或る程度離れた空間にも存在出来るので、吸着効率が良くなり、結果として細胞付着能の向上に繋がる。

【0014】

【実施例】以下に、本発明に依る動物細胞培養用担体の1例として実施例の若干を示すか、本発明は之等の実施例に限定されるものではない。

【0015】実施例1

マーセル化したセルロース製連続発泡体に、エピクロロヒドリンを介してポリエチレンジイミンを共有結合させ動物細胞培養用担体とした。ポリエチレンジイミンには分子量1,000のものをを用い、セルロース製連続発泡体には細胞培養に適した大きさである一辺の長さが1mmのキュービック状に裁断したものをを用いた。【酒伊エングニヤリ

ング製)

【0016】実施例2

マーセル化したセルロース連続発泡体に、エピクロロヒドリンを介してポリエチレンジイミンを共有結合させ動物細胞培養用担体とした。ポリエチレンジイミンには分子量1,800のものをを用い、セルロースの連続発泡体は実施例1と同様な大きさに裁断した物を用いた。

【0017】実施例3

マーセル化したセルロース連続発泡体をモノクロロ酢酸と反応させてカルボキシメチルセルロースとし、そのカルボキシル基とポリエチレンジイミンのアミノ基とを縮合させて酸アミド結合させ動物細胞培養用担体とした。ポリエチレンジイミンには分子量10,000のものをを用い、セルロースの連続発泡体は実施例1と同様な大きさに裁断した物を用いた。

【0018】実施例4

マーセル化したセルロース連続発泡体をモノクロロ酢酸と反応させてカルボキシメチルセルロースとし、静電的引力によりポリエチレンジイミンを結合させて動物細胞培養用担体とした。ポリエチレンジイミンには分子量70,000のものをを用い、セルロースの連続発泡体は実施例1と同様な大きさに裁断した物を用いた。

【0019】実施例5

セルロース連続発泡体を一辺の長さが3mmのキュービック状に裁断し、実施例1と同様な方法で動物細胞培養用担体とした。

【0020】比較例1

架橋デキストランビーズの表面にN,N,N-トリメチル-2-ヒドロキシアミノプロピル基を導入したファルマシア製サイトデックス(Cytodex2)を動物細胞培養用担体とした。

【0021】比較例2

架橋デキストランビーズの表面をジエチルアミノエチル基の2量体を導入したファイファー・アンド・ランゲン(Pfeiffer&Langen)社製ドーマセル(Dormacell)を動物細胞培養用担体とした。

【0022】具体的実施例

実施例1～5及び比較例1～2を動物細胞培養用担体として細胞培養を行い、細胞増殖が定常状態に達した時の各担体に於ける固定化生細胞数と細胞が生産する有用物質の濃度を測定した。

【0023】細胞数は担体をトリプシン処理した後、血球計算盤で測定した。培地には極東製薬社製のE-RDF培地にインスリン、エタノールアミン、トランスフェリン、セレンウムなどの細胞増殖を促す物質を添加した物を用いた。固定化は繊維芽細胞及び浮遊性細胞の2つをそれぞれの担体に対して試みた。繊維芽細胞にはヒト・エリスロホエチン(以下SP0と記載)遺伝子を組み込んだマウスL929株を、浮遊性細胞には抗体を生産するマウスハイブリドーマ(6-3P株)を用いた。

【0024】培養はペトリ皿での静置培養と、直接気泡通気を伴う横型内筒回転型バイオリアクター（酒伊エンジニヤリング製）による連続培養の2法で行った。バイオリアクターでの培養の場合、担体の充填率は培養液の体積に対して15%とした。実施例結果

下記の表の通り、本発明の担体は一般の担体に比べて高密度の細胞固定化と極めて高い物質生産性を実現している。

【0025】

第1表 繊維芽細胞の細胞密度と細胞が生産したEPO濃度

(細胞密度 細胞個数/担体体積 cells/ml)
(EPO濃度 単位/培養体積 U/ml)

	ペトリ皿 細胞密度	バイオリアクター 細胞密度 EPO濃度	
実施例1	8.3×10^6	1.6×10^7	6.5
実施例2	4.3×10^6	1.1×10^7	4.2
実施例3	3.0×10^6	1.0×10^7	4.0
実施例4	3.3×10^6	9.4×10^6	3.8
実施例5	7.5×10^6	1.8×10^7	6.6
比較例1	8.8×10^5	1.8×10^6	1.1
比較例2	1.7×10^6	1.6×10^6	0.9

【0026】

第2表 浮遊性細胞の細胞密度と細胞が生産した抗体濃度

(細胞密度 細胞個数/担体体積 cells/ml)
(抗体濃度 抗体重量/培養体積 mg/ml)

	ペトリ皿 細胞密度	バイオリアクター 細胞密度 抗体濃度	
実施例1	1.3×10^7	8.5×10^7	10
実施例2	8.1×10^6	8.0×10^7	10
実施例3	4.5×10^6	1.0×10^7	6
実施例4	3.9×10^6	9.4×10^6	6
実施例5	8.4×10^6	7.0×10^7	10
比較例1	4.4×10^6	2.8×10^6	0
比較例2	2.8×10^5	6.2×10^4	0

【0027】

用担体は動物細胞に最適のカチオン基を保有しているの

【発明の効果】以上説明した様に本発明の動物細胞培養 50 して、高密度の固定化が実現出来る。更に、本発明の担体

の特殊な形状が物理的衝撃から細胞を守り、細胞周辺の培地等を速やかに代謝するので大量培養時の過酷な条件下でも培養が可能になり、培養細胞を利用する各産業は

目的に応じた種々の培養法にこの担体を利用出来る様になる利点を有している。